

Opinnäytetyö (AMK)

Laboratorioala

Laboratorioanalyttikko

2010

Maritta Pohjansalo

# MENETELMIEN KEHITYS IHMISEN VAP-1 KALVOPROTEIININ LIGANDIN ETSIMISEKSI



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU  
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Maritta Pohjansalo

## MENETELMIEN KEHITYS IHMISEN VAP-1 KALVOPROTEIININ LIGANDIN ETSIMISEKSI

Opinnäytetyössä on kehitetty ihmisen kalvoproteiini VAP-1:n (vaskulaarinen adheesiomolekyyli-1) karakterisoinnin työmenetelmiä, jotka ovat osa tutkimusta sen toistaiseksi vähän tunnetun ligandin (vastinmolekyylin) etsimiseen. Adheesiomolekyylit välittävät lymfosyyttien kulkeutumista vastinmolekyylien avulla ja tapahtuma on tärkeä osa immuunipuolustusta.

Kun tehdään mutaatio molekyylin DNA:n nukleotidiin, pystytään tuottamaan muokattua proteiinia ja käyttämään sitä molekyylin ominaisuuksien tutkimiseen. Tarkoituksena oli tuottaa kolmenlaisia VAP-1<sub>D386N</sub> – mutanttiproteiineja stabiilien tuottolinjojen avulla ja tutkia niitä proteiinitasolla. Karakterisoinnilla varmistettiin, että transfektantit toimivat halutulla tavalla ja että suuritöiset tuottolinjat kannatti valmistaa.

Työssä tehtiin kohdistettu mutageneesi kolmeen DNA-konstruktiin, jotka transfektoitiin nisäkässoluihin. Transientteja solulinjoja ylläpidettiin ja niistä tehtiin immunovärjäystestauksia, jotka analysoitiin virtausytometrillä. Niiden solulysaateista tehtiin aktiivisuuskokeita. Kun stabiilit tuottolinjat oli tehty, mutantti- ja villityypin proteiinia puhdistettiin immunoaffiniteettikromatografialla. Proteiinit analysoitiin myös SDS-PAGE:lla. Mutaatiot onnistuivat DNA- konstrukteihin ja niistä kahdesta saatiin transfektoitua transientit solulinjat. Aktiivisuuskokeiden jälkeen todettiin, että stabiilit tuottolinjat voidaan tehdä, sekä aloittaa tutkimus proteiinitasolla ja mahdollisesti käyttää mutantteja vastinmolekyylin kalastukseen.

Työ on tehty Turun yliopiston Medicityn tutkimuslaboratoriossa yksityisessä tutkimusryhmässä.

ASIASANAT:

Kalvoproteiini, VAP-1, ligandi

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Laboratory Technology | Laboratory Analyst

28.3.2010 | Total number of pages 47

Instructor(s): Heli Elovaara, FT; Ilari Suominen, FT

Maritta Pohjansalo

# DEVELOPMENT OF METHODS TO FIND A LIGAND FOR HUMAN TRANSMEMBRANE PROTEIN VAP-1

This thesis presents methods for the characterization of the human transmembrane protein VAP-1 (vascularadhesion protein-1). The methods are part of a research to find a less well known ligand of the molecule. Adhesion molecules mediate the trafficking of lymphocytes by means of ligands, which plays an important role in immunologic defence.

When a mutation is made to the single nucleotide in DNA, the molecule is able to produce a modified protein which can be used to study protein characteristics. The purpose was to produce three types of VAP-1<sup>D386N</sup> mutant proteins with stable cell lines for protein level studies. The characterization was intended to ensure that transfectants operate as desired and that the considerable effort required by cell lines was profitable.

In this project the methods used comprised targeted mutagenesis for three DNA constructs which were transfected to a mammalian cell line, cell culturing and testing them by immunostaining and analyzing the staining results by flowcytometry. The activity of cell lysates was tested. Mutant and wild-type proteins were purified by immunoaffinitychromatography of stable cell lines and analyzed by SDS-PAGE. Mutations were successfully performed in the DNA constructs and two of them were successfully transfected for transient cell lines. After running activity tests it was shown that stable cell lines are feasible and that research can be initiated at protein level, possibly using the mutants for ligand fishing.

This study was carried out in research group at MediCity Research Laboratory , University of Turku.

.

## KEYWORDS:

transmembrane protein,VAP-1, ligand

# SISÄLTÖ

<b>1 JOHDANTO</b>	<b>6</b>
<b>2 TAUSTAA</b>	<b>7</b>
2.1 Kalvoproteiini VAP-1	7
2.2 Työn tarkoitus	9
<b>3 TYÖMENETELMÄT</b>	<b>11</b>
3.1 Yhdistelmä- DNA- tekniikka	11
3.1.1 PCR	12
3.1.2 Mutaatio	13
3.2 Soluviljely ja transfektio	14
3.3 Virtaussytometria	16
3.4 Immunosytokemia	17
3.5 Immunoaffiniteettikromatografia	18
3.6 Amplex-assay	19
3.7 Proteiinimittaus	19
3.8 SDS- PAGE	20
<b>4 TYÖMENETELMIEN KÄYTÄNNÖN TOTEUTUS</b>	<b>21</b>
4.1 VAP-1 konstruktien pistemutaatio	21
4.2 Soluviljely ja transfektio nisäkässolulinjaan	26
4.3 Immunofluoresenssivärjäys VAP-1 transfektoiduille soluille	30
4.4 Analysointi virtaussytometrillä	30
4.5 Immunoaffiniteettikromatografia	33
4.6 Amplex-assay VAP-1/HEK-lysaateille	35

4.7 Proteiininimittaus	37
4.8 SDS-PAGE	39
<b>5 TULOSTEN TARKASTELU JA POHDINTA</b>	<b>41</b>
<b>6 LÄHTEET</b>	<b>43</b>
<b>LIITTEET</b>	

## 1 Johdanto

Proteiinit osallistuvat käytännössä suoraan kaikkiin solun toimintoihin. Ne toimivat erilaisissa tehtävissä, kuten esimerkiksi monimutkaisten rakenteiden osina, solun kalvojen osina, kuljettajamolekyyleinä, hormoneina ja entsyymeinä. Biologiset kalvot sisältävät lipidien lisäksi kalvoproteiineja, jotka ryhmitellään sen mukaan, miten polypeptidiketju on asettunut kalvon suhteen.<sup>1</sup>

VAP-1 on tyypin II kalvoproteiini.<sup>1</sup> VAP-1, eli vaskulaarinen adheesioproteiini-1, on endoteelisoluissa esiintyvä adheesiomolekyyli. Sen on osoitettu välittävän valkosolujen sitoutumista verisuonten endoteeliin ja monivaiheisen tarttumistapahtuman kautta se mahdollistaa valkosolujen tunkeutumisen verisuonen seinämän läpi verenkierrasta kudoksiin. Valkosolun siirtyminen verenkierrasta kudokseen edellyttää sen kiinnittymistä verisuonen seinämään. Tämä kiinnittyminen tapahtuu valkosolun pinnalla sijaitsevan vastinmolekyylin ja endoteelisolun pinnan adheesiomolekyylien välityksellä. Tämä tapahtuma on välttämätön toimivalle immuunipuolustukselle.<sup>2</sup> Joskus immuunipuolustuksen mekanismeja säätelevät tekijät häiriintyvät ja reaktio kääntyy elimistön omia rakenteita vastaan. Tämä voi johtaa kroonisen tulehdussairauden syntyyn. Immuunipuolustuksen virheellinen toiminta löytyy usein kansantaloudellisestikin merkittävien sairauksien, esimerkiksi nivelreuman ja monien tulehduksellisten maksa- ja suolistosairauksien, taustalta.<sup>3</sup>

Tässä opinnäytetyössä kehitetään VAP-1:n karakterisoinnin työmenetelmiä. Ne ovat osa tutkimusta, jonka avulla voidaan jatkaa vastinmolekyylien etsimistä. VAP-1:n vastinmolekyyli valkosolun pinnalla oli työtä aloitettaessa vielä tunnistamaton<sup>4</sup>. Sen jälkeen tutkimusryhmässämme on löytynyt yksi potentiaalinen vastinmolekyyli. Tutkimusryhmä tunnisti Siglec-10:n (sialihappo sitoutuva immunoglobuliinityyppinen lektiini) olevan VAP-1:n valkosolun pinnan vastinmolekyyli.<sup>5</sup>

Pistemutaatiot, jotka aikaansaatii PCR- menetelmää käyttäen, tehtiin kolmeen erilaiseen DNA- konstruktiin (pCDNA-3 vektori, johon on kloonattu VAP-1 geenit) tarkoituksena tuottaa kolmenlaisia VAP- 1 <sup>D386N</sup> mutanttiproteiineja :

VAP-1<sub>D386N</sub>, VAP-1<sub>D386N+C-His</sub>, VAP-1<sub>D386N+N-His</sub>. Mutaatiot tehtiin kohtaan Asp386. Eristetyt ja sekvensoidut mutanttikonstruktit transfektoitiin kemiallisella menetelmällä nisäkässoluihin. Solulinjoja ylläpidettiin, soluista hajotettiin ja kerättiin solulysaattia, josta tehtiin aktiivisuuskokeita (Amplex Red- menetelmä), oletuksena proteiinin mahdollinen inaktivoituminen. Solulinjojen transfektiotehokkuutta mitattiin immunofluoresenssivärjäyksellä käyttämällä VAP-1 spesifistä vasta-ainetta ja tulokset analysoitiin virtausytometrillä. Varsinaiset pysyvät tuottosolulinjat tehtiin niistä mutanttikonstrukteista, joilla oli nähtävässä kertaluonteisten transfektanttien aktiivisuuskokeissa inaktiivisuutta ja joiden transfektiot onnistuivat hyvin. Myös näitä solulinjoja ylläpidettiin, kerättiin solulysaattia ja tarkistettiin stabiilisuutta. Näistä solulysaateista, sekä villityypin solulysaateista, puhdistettiin proteiini immunoaffiniteetti-kromatografialla proteiinitason aktiivisuuskokeita varten.

Työ on tehty Turun yliopiston lääketieteellisessä tiedekunnassa professori Sirpa Jalkasen tutkimusryhmässä. Kiitän häntä mahdollisuudesta tehdä opinnäytetyö, ja kiitokset myös ohjaajalleni FT Heli Elovaaralle sekä muille, jotka antoivat neuvoja tähän opinnäytetyöhön.

## 2 Taustaa

### 2.1 Kalvoproteiini VAP-1

Kalvoproteiinit ovat solukalvon rakenteeseen kuuluvia proteiineja, jotka ulottuvat kalvon läpi. Niiden tehtävänä on kuljettaa aineita solukalvon läpi, toimia entsyyminä, toimia reseptorina ja solujen välisenä tunnistimena. Ne luokitellaan sen mukaan, miten kalvoproteiini on asettunut kalvon suhteen. Tyypin I ja II kalvoproteiineissa on vain yksi kalvoon ankkuroiva osa (kalvon lävistävä  $\alpha$ -kierre). I tyypissä polypeptidiketjun alku- eli aminopää on kalvon ulkopuolella ja

loppu- eli karboksipää kalvon sisäpuolella. II tyypillä tilanne on päinvastainen, eli aminopää on kalvon sisäpuolella. Edellä mainitut ovat integraalisia kalvoproteiineja. Tyyppi III sisältää samassa polypeptidiketjussa useita kalvoon ankkuroivia osia. Tyyppi IV sisältää useita kalvoon ankkuroivia osia, mutta ne ovat eri polypeptidiketjussa. V tyypissä on lipidiankkuri ja VI tyypissä on sekä lipidiankkuri että kalvoon kiinnittyvä polypeptidiketjun osa (perifeeriset kalvoproteiinit).<sup>1</sup>

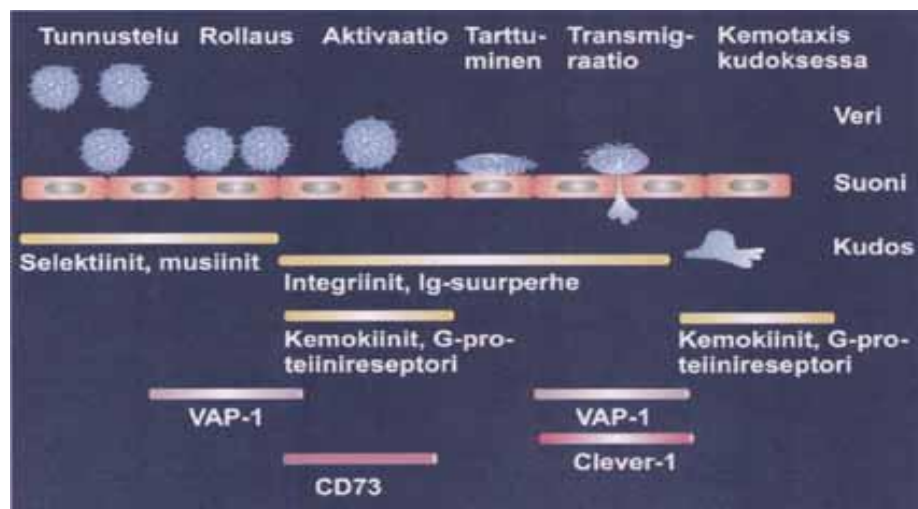
Kalvoproteiinit ovat usein glykoproteiineja, joissa on sekä N- että O-kytkettyjä sokereita. Hiilihydraattiosa on kiinnittynyt joko aspargiinitähteen sivuketjun tyypiatomiin (N-kytketyt glykoproteiinit), tai seriini- tai treoniinitähteen sivuketjun happiatomiin (O-kytketyt glykoproteiinit). Glykoproteiineja on paljon solukalvon uloimmilla osilla ja ne muodostavat solun pinnalle hiilihydraattisuojaan. Hiilihydraattiketjun lisääminen proteiinimolekyyliin muuttaa sen ominaisuuksia.<sup>1</sup>

VAP-1 (vaskulaarinen adheesioproteiini-1) on II tyypin kalvoproteiini ja sillä on todistettusti tärkeä rooli valkosoluliikenteessä. Lymfosyyttien siirtymisen verenkierrosta kudokseen mahdollistavat välittäjä-molekyylit eli adheesiomolekyylit, jotka ovat usein transmembraanisia glykoproteiineja. Niiden avulla lymfosyytti kykenee kiinnittymään verisuonen seinämään ja siirtymään sitä peittävän endoteelisolukerroksen läpi kohdekudokseen. Adheesiomolekyylit ovat solun pintamolekyyliä, joita esiintyy verisuonten seinämän endoteelisoluissa sekä lymfosyyttien pinnalla. Ne tunnistavat vastinmolekyyliinsä lymfosyytissä tai endoteelisolussa, sitoutuvat siihen ja aikaansaavat lymfosyytin erkanemisen verivirrasta, kiinnittymisen eli adheesion verisuonen seinämään ja siirtymisen kudokseen (transmigraatio). Tämä tapahtuma on tärkeä immuunipuolustusjärjestelmässä.<sup>3</sup> Valkosolujen siirtyminen verestä kudokseen on esitetty kuvassa 1.

VAP-1:tä ilmennetään endoteelisolun pinnalla sen aktivoiduttua esimerkiksi tulehduksen yhteydessä. Lymfosyytit kiertävät jatkuvasti veren ja imukudosten väliä etsien tauteja aiheuttavia mikrobeja elimistöstä. Kun lymfosyytti kohtaa spesifisen antigeenin, tapahtuu aktivaatio ja lymfosyytti poistuu verenkierrosta ja puolustusreaktiot kohdistuvat juuri niihin kudoksiin, joissa taudinaiheuttajat



ovat <sup>3</sup>. VAP-1:n ulkopuolisella osalla on amiinioksidaasientsyymiaktiivisuutta. Se osallistuu vierimisilmion aikaansaamiseen, joka liittyy edellä kuvattuun siirtymiseen verestä kudokseen, ja amiinioksidaasi-inhibiittorit estävät sen toiminnan.<sup>1</sup>



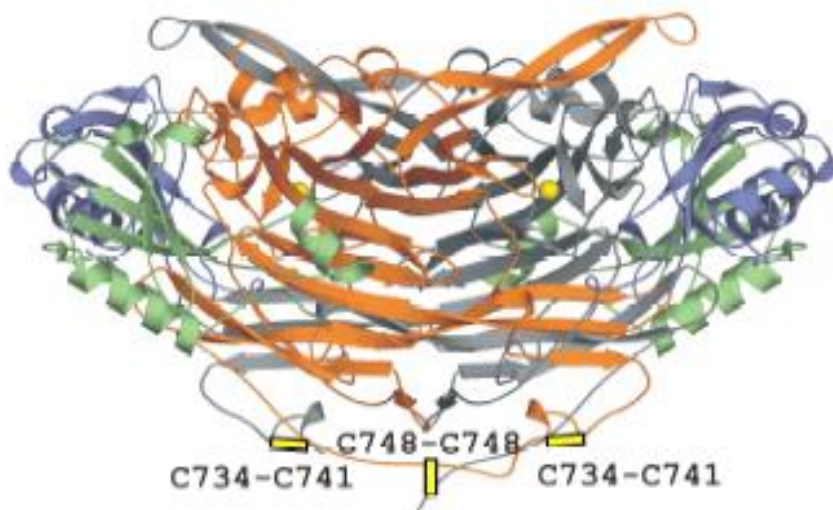
Kuva 1. Valkosolujen siirtyminen verestä kudokseen. (www. ktl.fi [viitattu 22.8 2009] ).

## 2.2 Työmenetelmien tarkoitus

VAP-1 on entsyymi, jonka aktiiviseen keskukseen tehdään muutos. Pistemutaatiossa yksi nukleotidi molekyylin DNA:ssa muutetaan toiseksi. Rakennetestien avulla tiedetään, että aminohappo Aspartaatti 368 toimii ns. yleisenä emäksenä (engl. general base) ja se on tärkeä molekyylin toiminnan kannalta. Sen muutos varauksettomaksi Asparagiiniksi mahdollistaa toiminnan tarkemman merkityksen tutkimisen.<sup>4,6</sup>

Työmenetelmät olivat osa tutkimusta, jonka oletuksena on, että Asp 368 kohtaan tehty mutaatio muuttaa VAP-1 entsyymien inaktiiviseksi, mutta ei estä sen vastinmolekyylin sitoutumista eikä sisäisen aputekijän muodostumista. Entsymaattisen reaktion aikana vastinmolekyyli sitoutuu kovalenttisesti aputekijään (kofaktori). Mutaation seurauksena oletetaan, ettei se irtoa. Tätä ominaisuutta voitaisiin käyttää tuntemattoman vastinmolekyylin tunnistamisessa.<sup>4</sup>

Työmenetelmien tarkoituksena oli selvittää, kannattaako stabiileja tuottolinjoja valmistaa em. proteiinitason tutkimuksia varten. Tarkoituksena oli tuottaa kolmenlaisia VAP-1<sub>D386N</sub> mutanttiproteiineja: VAP-1<sub>D386N</sub>, VAP-1<sub>D386N+C-His</sub>, VAP-1<sub>D386N+N-His</sub>. Kahdessa DNA-konstruktissa on mukana N- ja C-terminuksessa histidiinihänkä (6 histidiiniä). Tätä ominaisuutta voidaan käyttää puhdistuksen apuna kelatoitua nikkeliä käyttäen. VAP-1 proteiini voidaan puhdistaa sen avulla solulysaatista, jos proteiinia saadaan tuotettua tarpeeksi.<sup>4</sup>



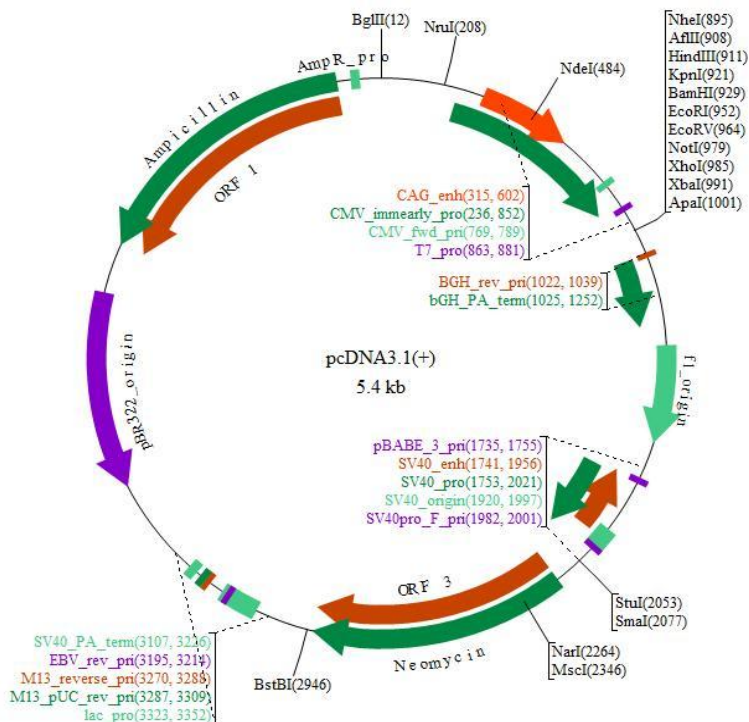
Kuva 2. Kristallografinen kuva VAP-1 molekyylistä. Aktiiviset keskukset näkyvät keltaisella värillä merkityissä kohdissa molekyylin sisällä. (kuva: Airene ym. 2005)

### 3 Työmenetelmät

#### 3.1 Yhdistelmä -DNA -tekniikka

Geenien toimintaa, niiden säätelyä ja geenien tuotteita on hankala tutkia omassa ympäristössään. Yhdistelmä- DNA-tekniikka mahdollistaa halutun geenin eristämisen ja sekvensoimisen (nukleotidijärjestyksen määrittäminen), ja se voidaan siirtää sellaiseen isäntäorganismiin, joka tunnetaan paremmin ja on helpommin hallittavissa, mm. DNA-konstruktin. Tekniikka perustuu restriktioentsyymien käyttämiseen DNA:n katkomisessa tietyn kokoisiksi DNA-jaksoiksi, DNA-jaksojen takaisin yhteen liittämiseen ligaasientsyymillä, plasmidien käyttämiseen kuljettimena DNA-jaksojen siirtämisessä organismista toiseen, ja itse siirtotapahtumaan eli transformaatioon. Yhdistelmä- DNA-molekyylin valmistamista näitä neljää menetelmää käyttäen sanotaan kloonaukseksi.<sup>7</sup>

Plasmidit ovat rengasrakenteisia DNA- molekyyliä. joita esiintyy luonnostaan eri bakteerilajeilla ja joillakin eukaryooteilla, kuten hiivoilla. Yhdistelmä- DNA-tekniikassa plasmideja käytetään yleisesti vektoreina, kun halutaan siirtää vierasperäistä DNA:ta isäntäsoluun. Toimivan yhdistelmä- DNA - vektorin luomiseksi tulee plasmidin sisältää isäntäsolun mukainen ori- alue (engl. origin of replication), selektiogeeni (esimerkiksi resistenssi jollekin antibiootille), sekä tunnistuskohta /kohtia restriktioentsyymeille.<sup>7</sup> Kuvassa 3 on esitetty pcDNA 3.1(+) - plasmidivektorin kartta.



Kuva 3. pcDNA 3.1(+) plasmidivektori ([www.biovisualtech.com](http://www.biovisualtech.com) [viitattu 3.12.2009]).

### 3.1.1 PCR

Polymeraasiketjureaktion (PCR, engl. Polymerase chain reaktion) avulla voidaan lyhyessä ajassa monistaa suuria määriä DNA-jaksoja, jotka sijaitsevat nukleotidisekvenssiltään tunnettujen kahden DNA- jakson välissä käyttäen kahta erilaista, tunnettua aluketta, jotka sitoutuvat kaksinauhaisen DNA:n eri juosteisiin, monistettavan alueen vastakkaisiin päihin. Niiden väliin jäävää DNA- jaksoa monistetaan templaattina olevasta kaksijuosteisesta DNA: sta. Reaktiossa käytetään DNA-polymeraasia, joka kestää korkeita lämpötiloja inaktivoitumatta.

Reaktio tapahtuu kolmessa osassa. Denaturointivaiheessa monistettavan eli templaatti- DNA:n juosteet erkanevat toisistaan korkeassa lämpötilassa, jotta alukkeet voivat sitoutua siihen ns. annealing-reaktiossa, kun lämpötila laskee hetkellisesti. Viimeisessä vaiheessa lämpötilaa nostetaan ja reaktioseoksessa olevat nukleotidit liittyvät mallina olevaan juosteeseen vastinpareiksi templaatin mukaan. Lämpötila nostetaan ja kaikki nauhat irtoavat toisistaan. Kun näitä vaiheita toistetaan sykleinä (yleensä 15- 40 kertaa), saadaan monistettua alun perin pienestä määrästä suuri määrä tiettyjä DNA-jaksoja automatisoidulla PCR-laitteella.<sup>7</sup>

### 3.1.2 Mutaatio

Proteiinien geneettisessä muokkauksessa, eli mutageneesissa, muokataan proteiinia koodittavaa geeniä siten, että saadaan tuotettua ominaisuuksiltaan muunneltua eli mutatoitua proteiinia. Muokkauksella voi olla hyvin monenlaisia tavoitteita eri geenitekniikan aloilla. Myös tutkittaessa yksityiskohtaisesti proteiinien rakenteen ja toiminnan välistä vuorovaikutusta, geneettinen muokkaus on tärkeä työväline.

Kun halutaan aikaansaada tarkalleen tietynlainen mutaatio ennalta määrättyyn kohtaan geenissä, käytetään kohdistettua mutageneesia. Geenistä ja geenituotteista pitää olla mahdollisimman paljon etukäteistietoa, jotta pystyy perustellusti ennustamaan järkeviä emäsmuutoksia, eli miksi halutaan mutatoida juuri tietty aminohappo pitkästä peptidiketjusta. Kun saadaan pääteltyä, minkälainen aminohappomuutos halutaan tehdä proteiinissa, käytetään geneettistä kodonitaulukkoa apuna halutun emäsmuutoksen tekoon.<sup>8</sup>(Emäkset: DNA:ssa adeniini A, tymiini T, sytosiini C tai guaniini G. Lähetti RNA:ssa on tymiinin paikalla urasiili U). Jokainen RNA:n nukleotidikolmikko (kodoni), eli ketjun kolme peräkkäistä nukleotidia, koodaa proteiinin yhtä aminohappoa. Kun proteiinia valmistetaan, geenin DNA kopioidaan lähetti -RNA:ksi, jonka mukaan proteiini tuotetaan. Aminohappoja on 20 erilaista ja ne eroavat sivuketjuiltaan, muuten rakenteet ovat hyvin

samantapaiset. Proteiinin primaarirakenne vastaa aminohapposekvenssiä. Proteiini ei toimi suorana aminohappoketjuna, vaan se laskostuu saavuttaen kolmiulotteisen eli tertiaarisen rakenteen (ks kuva 2).<sup>9</sup>

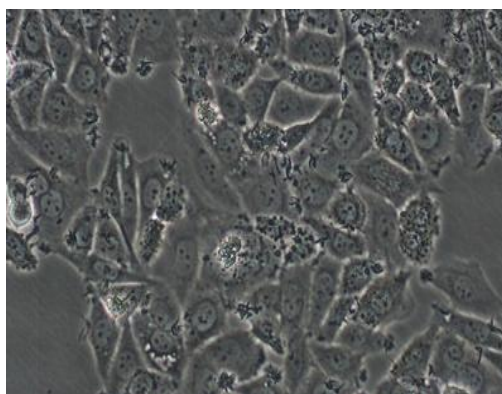
”Kohdistettua (PCR) - mutageneesia käytetään hyvin paljon proteiininmuokkauksessa, kun halutaan muuttaa jokin aminohappo toiseksi, esim. tutkittaessa mitkä aminohapot entsyymien aktiivisessa keskuksessa osallistuvat ao. reaktioon, tai tutkia muokatun entsyymien toimintaa. Muuttuneet ominaisuudet kertovat, osallistuvatko ao. aminohapot reaktioon vai eivät.”<sup>8</sup>

### 3.2 Soluviljely ja transfektio

Kasvi- ja eläinsoluja voidaan kasvattaa keinotekoisesti laboratorio-olosuhteissa. Viljeltyt solut ovat luoneet perustan uudelle bioteknologialle, jossa solut tuottavat entsyymejä, monoklonaalisia vasta-aineita tai muita proteiineja. Soluviljelyolosuhteissa pyritään jäljittelemään kudosten olosuhteita mahdollisimman tarkoin ja sopivan elatusnesteiden tärkeys korostuu. Sen tulee sisältää kaikki solun elämälle välttämättömät orgaaniset ja epäorgaaniset yhdisteet. Happi- ja hiilidioksidipitoisuuden, pH:n ja lämpötilan tulee pysyä vakiona viljelyn aikana. Pitkän viljelyn aikana viljelymediumiin tarvitaan lisänä yleensä vasikan sikiöstä saatua seerumia, joka sisältää runsaasti kasvutekijöitä (Fetal calf serum, FCS). Alkuperästä riippuen solut kasvavat ja lisääntyvät joko vapaana suspensioissa tai vaativat kiinnittymisen viljelyastian pohjaan. Kasvatusta varten on tehty muovisia maljoja tai pulloja, jotka ovat pintakäsitelty sopivasti. Hyvissä oloissa solukko täyttää nopeasti koko käytettävissä olevan pinnan, ennen kuin normaaleille soluille tyypillinen kasvun tiheys- eli kosketusinhibitio pysäyttää kasvun. Sitä ennen solut voidaan irrottaa ja siirtää solut uusiin kasvatuspulloihin/maljoihin. Elinvoimaisimpia soluja voidaan näin siirrellä viikoista kuukausiin niiden menettämättä liikaa ominaispiirteitään. Sekundaarinen viljelmä voidaan saada alkuun pienellä määrällä soluja ja monistuuessaan maljan täyttää lopulta geneettisesti homogeeninen soluperhe eli kloonit.<sup>10</sup>

Soluviljelmään voidaan transfektoida haluttua DNA:ta tietyn tuottolinjan aikaansaamiseksi. Pysyvässä ekspressiossa saadaan aikaan pysyvä solulinja, jossa siirretty DNA on liittynään isäntäsolun genomiin. Ekspressio ei häviä tytärsoluilta kun solu jakaantuu. Väliaikaisessa ekspressiossa (engl. transient expression) ominaisuus katoaa lyhyen ajan kuluessa. Eri solulinjojen transfektioihin sopivat niille optimoidut menetelmät, mm. erilaiset kemialliset menetelmät tai sähköinen elektroporatio.<sup>7</sup>

Kemiallista menetelmässä käytettävä reagenssi tekee DNA-kompleksista pienen ja positiivisesti varautuneen, jolloin se voi olla vuorovaikutuksessa negatiivisesti varautuneiden proteoglykaanien kanssa solun pinnalla. Tätä seuraa endosytoosi ja DNA pääsee sytoplasmaan ja lopulta tumaan.<sup>11</sup>



Kuva 4. Alustaansa kiinnittyneitä soluja.([www.solunetti.fi](http://www.solunetti.fi) [ viitattu 3.11.2009])

Solulinjalla tarkoitetaan jatkuvasti jakautuvaa solupopulaatiota, jonka elinikä on rajaton. Kasvainkudoksesta tai primaarisoluviljelmästä saadaan aikaan pysyvä solulinja muuttamalla soluja geneettisesti esim. kemiallisten mutageenien, säteilyn tai virusten vaikutuksesta jolloin solut transformoituvat ja käyttäytyvät kasvainsolumaisesti. Tällaiset linjat sopivat hyvin tutkimusmateriaaliksi, mutta näillä soluilla on kuitenkin normaalista poikkeavia ominaisuuksia, kuten monien

erilaistuneiden piirteiden puuttuminen ja epänormaali kromosomimäärä. Eräs yleinen ihmisestä eristetty erilaistumaton solulinja on HeLa, jota käytetään paljon perustutkimukseen.<sup>12</sup> Solukantojen ja solulinjojen yleisiä lähteitä ovat American Culture Collection (ATCC) ja European Collection of Cell Cultures (ECCC).<sup>13</sup>

Soluviljelyä tehtäessä noudatetaan aseptisia työskentelymenetelmiä kontaminaatioiden välttämiseksi, koska kontaminoivat bakteerit, hiivat ja sienet kasvavat viljelyolosuhteissa nopeammin. Solujen käsittely tapahtuu puhdastilassa laminaari- ilmavirtauskaapissa ja sen tarkoituksena on suojata sekä viljeltäviä solulinjoja että työntekijää. Puhdastilassa työskenneltäessä pukeudutaan vaadittaviin suojavaatteisiin ja kiinnitetään huomiota myös henkilökohtaiseen (käsi-)hygieniaan sekä tilojen asianmukaiseen desinfiointiin. Käytettävien välineiden on oltava steriilejä.<sup>12</sup>

### 3.3 Virtaussytometria

Virtaussytometria FCM (Flow cytometry) on fluoresenssiin perustuva menetelmä, jossa fluoresoivalla aineella merkattuja soluja säteilytetään lasersäteellä ja solun lähettämän emission voimakkuus mitataan. Analysoitavat solut saatetaan yksisolususpensioksi ja imetään näyteputkesta kapeaksi virtaukseksi, joka johdetaan virtauskyvetiin. Siellä solut fokusoidaan hydrodynaamisesti vaippanesteen avulla kulkemaan yksitellen lasersäteen ohi. Fluoresenssin lisäksi mitataan valonsironta, suorasisironta tai sivusironta.

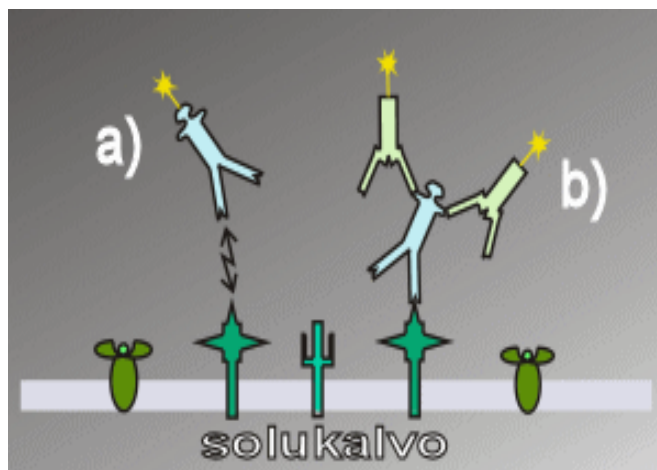
Tulokset tulkitaan käyttäen graafista esitystapaa. Histogrammi muodostuu yksittäisten solujen analysoinnista, ja jossa näkyy solujen lukumäärä sekä yhden tai useamman mittauksen arvot. Dot plot on kaksiulotteinen koordinaatisto jossa x- ja y- akselille asetetaan sironta - tai fluoresenssikanavien intensiteetit. X-akselilla näkyy fluoresenssin intensiteetit ja y-akselilla solujen lukumäärä. Jokainen tapahtuma näkyy yksittäisenä pisteenä koordinaatistossa. Solujen analysointi- ja lajittelukriteerit määritellään portittamalla (engl. gating) halutut populaatiot kuvaajissa.



Lajittelevista sytometreistä käytetään nimitystä FACS ( Fluoresence Activated Cell Sorter), ja sitä käytetään erilaisten solupopulaatioiden erotteluun. Mittauksessa solut kulkeutuvat kyvetistä suuttimelle, joka hajottaa virtauksen pisaroiksi. Samalla pisaraan kohdistuu sähköinen varaus niille partikkeleille, jotka sopivat laitteelle ennen lajittelua määriteltäviin lajittelukriteereihin. Suurjännitteiset poikkeutuslevyt poikkeuttavat varautuneet pisarat ja varauksettomat kulkeutuvat kohtisuoraa linjaa poistoon. Poikkeutetut, eli positiiviset, pisarat kerätään esim. putkiin tai kuoppalevyille.<sup>14, 15</sup>

### 3.4 Immunosytokemia

Immunosytokemialla tarkoitetaan immunologiaan perustuvia erikoistekniikoita, joiden perustana on vasta-aineiden käyttö haluttujen molekyylien paikantamisessa. Menetelmä perustuu vasta-aineen ja sen tunnistaman antigeenin väliseen reaktioon, jossa vasta-aine sitoutuu antigeeniin spesifisesti. Jotta antigeeninsä tunnistanut vasta-aine voidaan detektoida, siihen lisätään sopiva merkkiaine. Värjäykset voidaan tehdä joko ns. suoralla menetelmällä tai epäsuoralla menetelmällä. Kuvassa 5 on esitetty näiden menetelmien toimintaperiaate. Suorassa menetelmässä käytettävä vasta-aine on leimattu, joten kohdeantigeeni saadaan näkyväksi yhdellä vasta-ainekäsittelyllä. Epäsuorassa menetelmässä primaarivasta-aine ei sisällä merkkiainetta, vaan sille kehitetään oma sekundaarivasta-aine, johon merkkiaine liitetään.<sup>12</sup>



Kuva 5. "Vasta-ainevärjäys. a) suorassa menetelmässä leimattu vasta-aine sitoutuu spesifiseen isotooppiin. b) epäsuorassa menetelmässä tunnistus tapahtuu primaarisella vasta-aineella ja sen tunnistus osoitetaan leimatulla sekundaarivasta-aineella". ( [www.solunetti.fi](http://www.solunetti.fi) [ viitattu 3.11. 2009 ] ).

### 3.5 Immunoaffiniteetikromatografia

Affiniteetikromatografia on yksi nestekromatografisista menetelmistä. Se eroaa muista siinä, ettei sillä pyritä erottamaan näytteseoksen eri komponentteja toisistaan, vaan erottamaan jokin tietty yhdiste kaikista muista näytteessä esiintyvistä komponenteista. Menetelmää käytetään paljon proteiinien ja lääkeaineiden puhdistukseen. Affiniteetikromatografiassa stationaarifaasi on muodostettu sen pintaan sitoutuneista ligandeista. Ne pystyvät sitomaan sellaisia yhdisteitä, jotka ovat sopivia kooltaan, varaukseltaan ja poolisuudeltaan. Kaikki muut näytteessä olevat yhdisteet eluoituvat kolonnista ilman retentiota. Kolonnissa ligandeina voidaan käyttää vasta-aineita (immunoaffiniteetikromatografia), entsyymi-inhibiittoreita tai muita sopivia molekyylejä. Kiinnittynyt näytemateriaali voidaan eluoida eri tavoin, mm. muutamalla eluentin pH:ta, kuten tässä työssä. Kolonnin hiukkaskoossa on

otettava huomioon, että proteiinien ja muiden suurikokoisten biomolekyylien erotuksessa hiukkaskoon on oltava suuri (500- 400nm).<sup>16</sup>

### 3.6 Amplex-Assay VAP-1 /HEK- lysaateille

VAP-1 katalysoi reaktiota, jossa primaarinen amiini muutetaan vastaavaksi aldehydiksi. Reaktiossa muodostuu vetyperoksidia yhtä paljon kuin tuotetta. Amplex Red on pysyvä ja herkkä väriyhdiste, joka reagoi muodostuneen vetyperoksidin kanssa. Näin ollen lysaatissa olevan VAP-1:n katalysoiman, reaktiossa muodostuneen tuotteen määrä voidaan määrittää. Substraattina käytetään primaarisia amiineja. Koska solussa on muitakin entsyymejä, jotka katalysoivat samaa reaktiota kuin VAP-1, käytetään reaktiossa clorgyliiniä inhiboimaan näistä merkittävintä, eli monoaminioksidaasia. VAP-1:n katalysoima vetyperoksidin määrä saadaan käyttämällä VAP-1 inhibiittoria, semikarbatsidia. Sen aiheuttama vähäisempi värin muodostus kertoo siis VAP-1:n aktiivisen osuuden. Kinetiikkaa varten entsyymien muodostaman tuotteen määrä määritetään useassa substraattikonsentraatiossa.<sup>4</sup>

”Aktiivisuusmäärittäminen perustuu kahteen entsyymireaktioon. VAP-1:tä sisältävä näyte hapettaa substraattina käytetyn bentsylamiinin. Reaktiossa muodostuu myös vetyperoksidia. Detektoreaktiossa Amplex Red - reagenssi (*N*-10-asetyyli-3,7- dihydroksiphenoksatsiini) hapettuu fluoresoivaksi resorufiiniksi (7-hydroksi- phenoksatsi-3-oniksi) piparjuuriperoksidiaasin (engl. horseradish peroksidase, HRP ) ja vetyperoksidin läsnäollessa”.<sup>17</sup>

### 3.7 Proteiininimittaus

Solulysaateista mitattiin proteiinipitoisuuksia BioRadin reagensseilla. Mittaus perustuu Lowry- proteiinimääritysmenetelmään, joka on modifioitu lyhyemmäksi. Se on biokemiallinen menetelmä, jolla voidaan määrittää proteiinin kokonaispitoisuus liuoksesta. Pitoisuus määritetään värinmuutoksen avulla, joka mitataan kolorimetrisellä lukijalla tai spektrofotometrillä. Reaktiossa

kupari-ioni muodostaa värin hapettamalla peptidisidokset Folin- Ciocalteu-ragensilla. Absorbanssi mitataan aallonpituudella 750 nm.<sup>18</sup>

### 3.8 SDS-PAGE

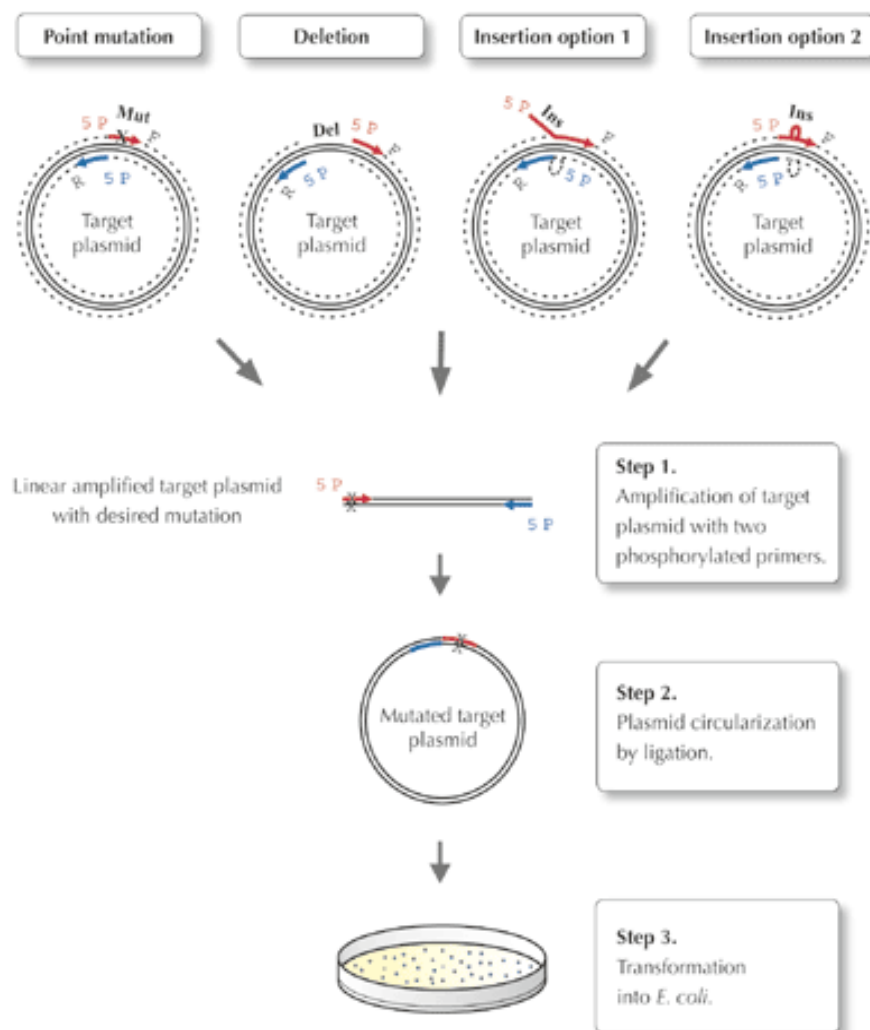
Elektroforeesilla pystytään erottelemaan sähköisesti varautuneet molekyylit, kuten aminohapot, proteiinit ja nukleiinihapot toisistaan käyttäen hyödyksi sähkökenttää. Positiivisesti varautuneet molekyylit (kationit) liikkuvat negatiivista napaa eli katodia kohti, ja negatiivisesti varautuneet anionit liikkuvat positiivista napaa eli anodia kohti.<sup>12</sup>

Proteiinien erottelu - ja analyysimenetelmänä on SDS-PAGE. (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis). Geeli erottelee proteiinit niiden koon perusteella ja näin saadaan selville proteiinin molekyylipaino. Ajo suoritetaan vertikaalisessa kaksiosaisessa slab- geelissä. Ennen ajoa proteiinien rikkisiltojen hajottamiseksi lisätään näytteeseen pelkistävää merkaptetaanolia ja näytteet keitetään SDS- molekyylin läsnä ollessa. Sen aiheuttama negatiivinen varaus peittää lineaarisen proteiinien alkuperäisen varauksen alleen, ja ne liikkuvat geelissä pääasiassa molekyylipainonsa mukaisesti. Jokainen näyte ladataan erillisiin näytekaivoihin ja jokainen proteiini saadaan eroteltua yksittäin elektroforeesilla.

Ajon jälkeen vyöhykkeet voidaan paikantaa värjäyksellä, tai vyöhykkeet voidaan siirtää nitroselluloosapaperille (Western- blot), jos visualisoinnissa halutaan käyttää vasta-aineita.<sup>15</sup>

## 4 Työmenetelmien käytännön toteutus

4.1 VAP-1- konstruktien pistemutaatio (engl. point mutation) käyttäen Phusion DNA-polymeraasi- menetelmää (Finnzymes).



Kuva 6. Mutaation työvaiheet Phusion-menetelmällä ([www.finnzymes.com](http://www.finnzymes.com) [viitattu 2.12.2009]).

Menetelmässä koko plasmidi monistetaan käyttäen fosforyloituja alukkeita (engl. primers), jotka ovat suunniteltu tuottamaan haluttu muutos. Monistettu lineaarinen PCR- tuote sisältää mutaation ja se palautetaan rengasmaiseen muotoon liittämällä päät yhteen ligaasi- entsyymillä. Saatu plasmidi voidaan transformoida kompetentteihin *E. coli* -soluihin.<sup>19</sup> Alukkeet on valmistanut Oligomer Oy. Ne laimennettiin 100 µM: ksi mukana tulevien ohjeiden mukaan. Työskentelylaimennos tehtiin 2,5 µM:ksi. PCR- reaktioiden pipetointikaavio on esitetty taulukossa 1. Taulukossa 2 on tähän työhön optimoidut olosuhteet, jotka ohjelmoidaan PCR-laitteeseen.

Alukkeiden sekvenssit : HE20 : cattgctgctggggaattccaccatag

HE22 : acgacccgctatgtgaatggaggctttg

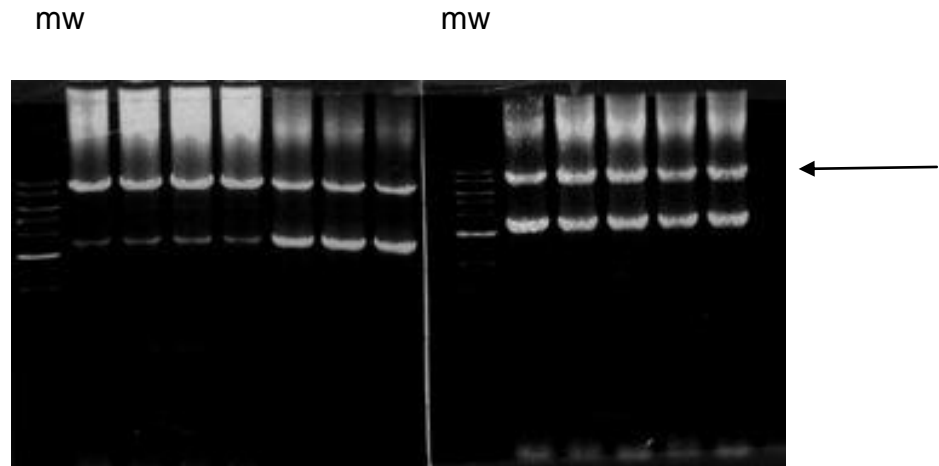
Taulukko 1. PCR- reaktion pipetointi

Phusion polymeraasi	10 µl
10 mM dNTP mix	1 µl
Forward- primer	10 µl
Reverse- primer	10 µl
templaatti	10 ng
vesi	50µl:ksi

Taulukko 2. Ohjelma PCR- laitteeseen.

Lämpötila °C	Aika
1. 98	30 sek.
2. 98	10 sek
3. 60	30 sek.
4. 72	5 min.
2. - 4. 35 sykliä	
5. 72	10 min.
6. 4	∞

Reaktio tehtiin neljäkertaisena, jotta saatiin tarpeeksi eristettävää materiaalia. PCR-tuote puhdistettiin ajamalla se 0,8 %:lla agarosigeelillä elektroforeesilaitteella (AGE). Ajon jälkeen geelit kuvannettiin. UV- valopöydän avulla geeliltä leikattiin talteen 9,4 Kb:n vyöhykkeet, eli bandit. Kokomarkkerina oli 1Kb:n standardi (NEB), jonka molekyylien painot tunnetaan (molecular weight). Kuvassa 6 nuolella merkityt 9,4 Kb:n fragmentit leikattiin ja puhdistettiin. Fragmentit eristettiin geelipaloilta käyttäen pylväspuhdistus-kittiä (QiagenQiaguick Gel-Extraction- Kit). PCR- tuote eluoitiin puhdistuspylvästä 25 µl: aan (kaupallinen puhdistettu vesi, Fluka.)



Kuva 7. PCR-tuotteet agarosigeelillä kuvattuna.

DNA liitettiin ligaasientsyymillä takaisin rengasrakenteiseen muotoon, jotta se voitiin siirtää ja monistaa bakteerisoluihin plasmidieristystä varten. T4-ligaasientsyymi (NEB) liittää yhteen kaksijuonteisten nukleinihappojen 5'-fosfaatti- ja 3'-hydroksipäät.

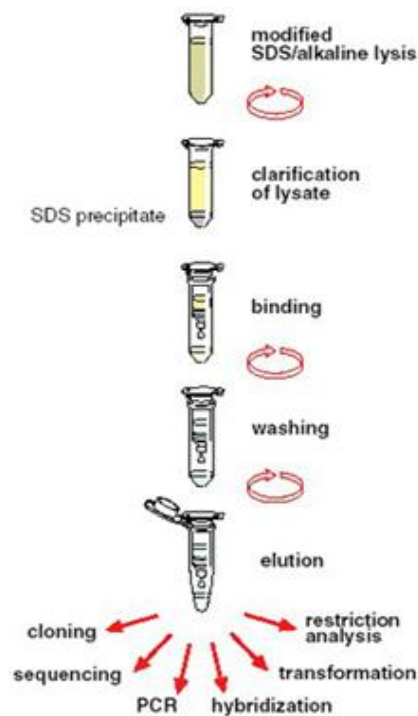
Taulukko 3. Ligaatio

Geelipuhdistettu PCR- tuote	17 $\mu$ l
T4 - DNA ligaasi- puskuri (NEB)	2 $\mu$ l
T4 - ligaasi- entsyymi (NEB)	1 $\mu$ l
Taustakontrolli : PCR-tuotetta	4 $\mu$ l
T4- ligaasi -puskuri	0,5 $\mu$ l

Ligaatioita inkuboitin 1 h / RT, jonka jälkeen reaktiot saostettiin alkoholisaostuksella. Pelletti liuotettiin 5  $\mu$ l: aan vettä. Tuote transformoitiin



elektroporapatiolla (1,5 µl) DH5α - *E.coli*- elektrokompetentteihin bakteerisoluihin. Niitä kasvatettiin 30- 60 min. 250 rpm:n heilutuksessa 37 °C:ssa, 300 µl:ssa SOC- mediumia (LB-medium + glukoosi). Kasvatuksista maljattiin LB- maljoille (Luria-broth), jotka sisältävät 50 µg/ ml ampisilliinia (ampisilliini- selektio). Maljoja inkuboitin yli yön 37 °C: ssa ja niillä ilmenneet pesäkkeet poimittiin kasvatukseen miniplasmidieristystä varten LB + amp.- mediumiin (o/n, 37 °C, 250 rpm). Kasvatuksessa DNA monistuu bakteerisolujen mukana ja se voidaan eristää. Miniplasmidieristykset tehtiin tarkoitukseen tehdyllä kitillä (NucleoSpin Plasmid, Macherey-Nagel, toimintaperiaate on esitetty kuvassa 7). Näin saadut kloonit lähetettiin sekvensointipalveluun (Biotekniikan keskus) automaattiseen sekvensointiin tunnettua aluketta käyttäen. Oikean nukleotidijärjestyksen omaavat kloonit, eli ne joissa mutaatio on onnistunut, valitaan isomman mittakaavan plasmidieristykseen, jotta saadaan tarpeeksi materiaalia työn jatkamiseen (NukleoBond Xtra Maxi, Macherey- Nagel). DNA- preppien konsentraatio mitataan spektrifotometrisesti aallonpituuksilla 260 nm ja 280 nm. Ratio  $A_{260} / A_{280}$  puhtaalle DNA:lle on 1.8 - 2.0.



Kuva 8. Miniplasmidieristuksen periaate ( [www.mn-net.com](http://www.mn-net.com) [viitattu 2.12.2009])

Kaikki menetelmät ovat löydettävissä yhdistelmä-DNA-tekniikkaa käsittelevästä kirjallisuudesta, mm. Sambrook, J ym. Molecular cloning: a laboratory manual 1 – 3.

Kaupallisten kittien käyttöohjeet löytyvät valmistajien verkkosivuilta :

[www.finnzymes.com](http://www.finnzymes.com)

[www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)

[www.mn-net.com](http://www.mn-net.com)

#### 4.2 Soluviljely ja transfektio nisäkässolulinjaan

Bakteerisolut eivät pysty muodostamaan monimutkaisia sokerirakenteita proteiineihin. Tämän vuoksi proteiinien tuottoa varten tutkittavat VAP-1 molekyylit oli transfektoitava eläinsolulinjaan. Mutaation sisältävät DNA-konstruktit sekä villityyppi hVAP-1 - kontrolli siirrettiin tässä työssä HEK- 293-EBNA -solulinjaan kemiallisella menetelmällä (Fugene HD Transfection reagent, Roche) transienttien solulinjojen tekoa varten. HEK (Human Emryonic Kidney - 293) - solulinja on alun perin saatu ihmisen munuaisen kudoksesta eristetyistä viljelmästä. HEK-EBNA-293 -solulinjaan on lisätty ominaisuus, joka parantaa proteiinien transfektoitumista ja stabiilisuutta.<sup>4</sup>

#### Soluviljely

Solut kasvatetaan pulloissa tiettyyn tiheyteen (n. 60- 80 % pinta-alasta) ja solut jaetaan, esim. 1:5. Solujen jakaminen (siirrostus) uudelleen proliferaatiota varten tapahtuu eri solulinjoilla eri tahdissa riippuen niiden jakautumisnopeudesta. Samalla tarkastellaan mikroskoopilla solujen kunto; onko näkyvissä kuolleita soluja, ovatko solut kunnolla kiinnittyneitä ja näkykö

bakteereita jne. Soluviljelmää ylläpidetään, kunnes hyväkuntoisia soluja on tarpeeksi transfektion suorittamiseen.<sup>4</sup>

Esimerkki solujen siirrostuksesta ja irrotuksesta :

1. Poistetaan viljelmän vanha medium
2. Pestään PBS- liuoksella (Phosphate–buffered saline), jotta saadaan vanhan kasvatusmediumin aineksia maljalta. Näistä mm. seerumi inhiboi entsyymien toimintaa.
3. Lisätään irrotuliuos, joka sisältää trypsiini -EDTA:ta (10 %). Trypsiini on haiman tuottama entsyymi ja sitä saadaan soluviiljelytöihin kaupallisista lähteistä. Trypsiiniä käytetään proteaasina ja se pilkkoo soluväliaineen proteiineja sekä solun pinnalta tarttumisreseptoriproteiineja. Irrotusliuosta lisätään maljan /pullon pohjan peittävä määrä.
4. Inkuboidaan 3-10 min. riippuen solukannasta. Ylitrypsinointi vaurioittaa soluja ja siksi jokaiselle solukannalle pitää etsiä optimiaika.
5. Kun suurin osa soluista näyttää irtoavan, lisätään trypsiiniä neutraloiva liuos (esim. HEC- medium) huuhdellen sentrifugiputkeen. Sentrifugaatio auttaa pääsemään eroon trypsiinistä. Solut suspensoidaan huolellisesti ja sentrifugoidaan.
6. Sentrifugaation jälkeen solut suspensoidaan viljelymediumiin ja jaetaan sopivassa jakosuhteessa uusiin kasvatuspulloihin /- maljoihin.<sup>13</sup>

### Soluviiljelyelatusaineet

Elatusaineina käytetään useimmiten kaupallisia mediuumeja, kuten RPMI-1640. Täydennyksenä käytetään 10%-prosentista fetaaalivasikan seerumia, joka sisältää runsaasti kasvutekijöitä. Antibioottisäinä käytetään yleensä penisilliini/streptomysiiniyhdistelmää, ihmisen solulinjoilla käytetään usein myös gentamysiiniä sieniä vastaan. Markkinoille on tullut myös uusia kasvatusaineita,

joihin ei tarvitse tehdä lisäyksiä. <sup>13</sup> LIITTEESSÄ 1 on esitetty tässä työssä käytetyt soluviljelymediumit.

### Transfektiot

Transfektioita varten solut irrotettiin edellä kuvatulla tavalla. Kun solut olivat sentrifugaation jälkeen pellettinä, ne resuspensoitiin yhteen ml:aan esim. HEC-liuosta. Osa soluista laimennettiin 1:10 0,4 prosenttiseen Trypan blue -liuokseen, jonka jälkeen solut laskettiin esim. Bürkerin- kammion avulla valomikroskoopilla. Lukumäärä jaetaan kymmenellä ja saadaan tulokseksi  $\times 10^6$  solua / ml. 6-kuoppalevyille pleitattiin kasvuun  $0,5 - 0,6 \times 10^6$  solua / kuoppa, jossa on 1 ml kasvatusmediumia. Kasvatettiin yli yön inkubaattorissa. Seuraavana päivänä pipetoitiin 12  $\mu\text{g}$  siirrettävää DNA:ta eppendorf- putkeen. Putket siirrettiin laminaarikaappiin ja niihin lisättiin 600  $\mu\text{l}$  Opti-MEM- mediumia. Lisättiin 30  $\mu\text{l}$  Eugene transfektio- reagenssia tipoittain liuokseen (määrä oli optimoitu tähän työhön aikaisemmin). Sekoitettiin ja inkuboitiin 15 min. /RT. Siirrettiin 105  $\mu\text{l}$  transfektioseosta / kuoppa, joilla pitäisi olla soluja 60- 80 % kuopan pohjan pinta-alasta. Transfektioitiin kerrallaan yksi 6-kuoppalevy mutatoitua DNA:ta ja yksi levy villityyppi - DNA:ta. Kasvatettiin inkubaattorissa yön yli. Kolmantena päivänä (transfektioaika n. 24 h) solut irrotettiin kuopilta, kerättiin, sentrifugoitiin ja laskettiin. Siirrettiin  $0,5 \times 10^6$  solua kahteen putkeen immunovärijäystä varten. <sup>4</sup>

### Solujen hajotus

Loput solut säilytettiin jäähauteella kunnes voitiin sentrifugoida liuos pois ja resuspensoida solut lyysispuskuriin solulysaatin tekoa varten: heilutus  $+ 4^\circ\text{C}$  :ssa 1-4 h. Sen jälkeen sentrifugoitiin 30 min. kylmäsentrifuugilla ( $+ 4^\circ\text{C}$  , 14000 rpm ) ja kerättiin lysaatti, joka säilöttiin  $- 20^\circ\text{C}$ :een. Lyysispuskuri rikkoo solukalvon ja näin saadaan soluissa tuotettu proteiini liuoksessa lysaattiin.

Kertaluonteisten transfektanttien lysaatit käytettiin alustaviin aktiivisuuskokeisiin jotta voitiin päättää, kannattaako stabiileja tuottolinjoja tehdä.<sup>4</sup>

### Tuottolinjojen valmistaminen

Varsinaiset pysyvät tuottolinjat tehtiin CHO- solulinjaan biokemian opiskelijan toimesta, joka transfektoi mutanttikonstruktit nukleofektioita käyttäen. CHO (Chinese hamster ovary)-solulinja on paljon käytetty linja biologian ja lääketieteen tutkimuksessa, erikoisesti rekombinanttien proteiinien tuotossa. Transfektio menetelmässä käytettiin Nucleo- Fector laitetta sopivilla sähköparametreillä ja soluspesifistä kittiä, jossa on optimoitu protokolla (Lonza, Finnzymes). Sen jälkeen tehtiin erottelu eli sorttaus immunovärjätyille soluille FACS Vantage cell sorter-virtaussytometrillä (BD Biosciences). Erottelu perustuu virtaussytometrin kykyyn tunnistaa fluoresoivalla leimauksella fluoresoiini isotiosyanaatilla (FITC) leimatut solut. Solut eroteltiin kolme kertaa. Erottelujen välissä soluja kasvatettiin n. 1 - 2 viikkoa ennen seuraavaa erottelua. Erotellut solut kasvatettiin viljelymediumissa, johon oli lisätty 1 mg/ ml genetisiiniä (G418 sulfaatti, Calbiochem). Se on antibiootti, joka toimii tässä yhteydessä selektiivisenä tekijänä.<sup>20</sup> Opinnäytetyön aikana hoidin tuottolinjoja ja keräsin lysaatteja proteiinin puhdistusta varten, sekä tein stabiilisuustestejä immunofluoresenssivärjäyksellä, jotka analysoitiin virtaussytometrillä.

Solutöiden menetelmät ja liuosohjeet löytyvät alan kirjallisuudesta. Mm. John E. Coligan ym. Current Protocols in Immunology. Laboratory manual 1-3. Sekä transfektio- reagenssien valmistajilta: [www.roche-applied-science.com/support](http://www.roche-applied-science.com/support)

[www.lonza.com](http://www.lonza.com)

### 4.3 Immunofluoresenssivärjäys VAP- 1 transfektoiduille soluille

Irrtotetut, lasketut ja pestyt solut (ks kohta 4.2) jaettiin kahteen putkeen niin, että putkiin saadaan  $0,5 \times 10^6$  solua / FACS- putki. Putket pidettiin jäällä. Soluille

lisättiin EPICS- 1 pesuliuosta, resuspentoitiin ja sentrifugoitiin (Immunofuugi). Solupelletit resuspentoitiin 10  $\mu\text{g}$  / ml:n konsentraatiossa FITC- konjugoitua VAP-1:n tunnistavaa vasta-ainetta (TK-8-14), joka oli laimennettu 100  $\mu\text{l}$ : aan EPICS-1- puskuria, sekä samoin laimennettuna negatiivinen kontrolli, FITC - 3G6 toisen putkeen. Inkuboitiin jäällä folioon käärittynä 20 min. Solut sentrifugoitiin ja pelletit pestiin EPICS-1:llä kaksi kertaa. Solupelletit pestiin kerran EPICS-2 -puskurilla (ilman seerumia, jolloin seerumijäämät saadaan pestyä pois). Pelletit resuspensoidaan EPICS-fix- liuokseen (säilytysliuos) odottamaan virtaussytometrillä analysointia. Määrittystä varten detektoiva vasta-aine oli kiinnitetty leimamolekyylisiin (FITC, Fluorescein Isothiocyanate), joka on fluoresoiva. LIITTEESSÄ 2 on EPICS- puskurien liuosohjeet.<sup>4</sup>

Menetelmät löytyvät alan kirjallisuudesta. Mm. John E. Coligan ym. Current Protocols in Immunology. Laboratory manual 1-3.

#### 4.4 Analysointi virtaussatometrillä

Immunofluoresenssivärjäyksellä värjätyt solut analysoitiin virtaussatometrillä transfektion jälkeen, sekä tuottolinjan stabiilisuutta testattaessa varmistaen etteivät solut ole inaktivoituneet. Mittauksessa pystytään selvittämään, kuinka monta prosenttia solupopulaatiosta on positiivisia.

Fluorokromi absorboi energiaa laserista ja se vapauttaa absorboituneen energian värähtelynä ja lämpönä, sekä emittoimalla pidemmän aallonpituuden fotoneja, mitä kutsutaan fluoresenssiksi. Toimintaperiaatetta on kuvattu luvussa 3.3. Kerallaan mitattava solumäärä voi olla  $5 \times 10^5$  -  $2 \times 10^7$  solua / ml.<sup>21</sup>

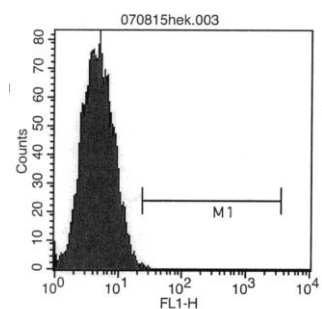
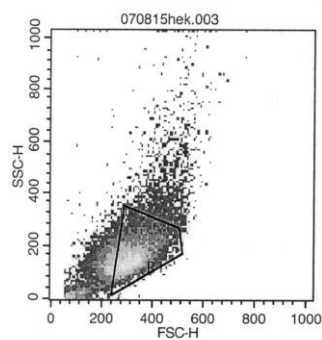


Kuva 9. FACScan, Becton Dickinson (www.kitmondo.com [viitattu 20.11.2009] )

Kuvassa 9 nähdään laitteen kontrollipaneeli, ajoliuossäiliö, jätessäiliö, käyttötilan valitsin, katkaisija sekä näyteputken paikka näytteen injektioimiseen. Ennen aloitusta täytettiin ajoliuossäiliö 3/4 FACSFlow- ajoliuoksella. Jätessäiliö tyhjennettiin ja lisättiin 200 ml FACSsafe- liuosta (sisältää desinfiointiainetta). FACScan käynnistettiin ensin ja sen jälkeen tietokone analysointia varten. Sen jälkeen paineistettiin ajoliuossäiliö, tarkistettiin ajoliuoksen suodin ja poistettiin mahdolliset ilmakuplat. Tehtiin DRAIN- ja FILL- toiminnot ilmakuplien poistamiseksi virtauskammiosta. Ajettiin tislattua vettä systeemin läpi, lopuksi laite asetettiin STANDBY- tilaan. Tietokoneelle ohjelmoitiin tarvittavat asetukset kuten tiedon keruu: paneelit ja muut näytetiedot, laiteasetukset, populaatioiden rajaukset, tietojen tallennus. Sekä analysointi: halutun populaation rajaus, markkareiden/ rajojen asettaminen, kunkin putken /näytteen analysointi, tulosten arviointi ja yhteenveto. Näyteputki asetettiin injektoriin ja aloitettiin mittaus.<sup>21</sup>

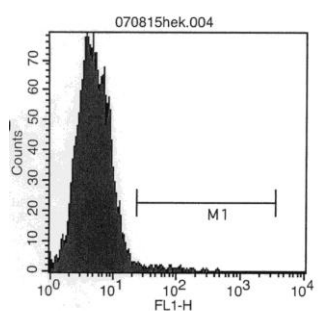
Sortteerauksen eli positiivisten solujen erottelun transfektoiduista solulinjoista teki biokemian opiskelija stabiilien tuottolinjojen tekoa varten.

Kuvissa 10 ja 11 on esitetty esimerkit mittauksen tulostuksista.



Sample ID: pHE-5 control

Marker	% Gated	Geo Mean	Median
All	100.00	4.68	4.61
M1	0.03	25.95	25.25

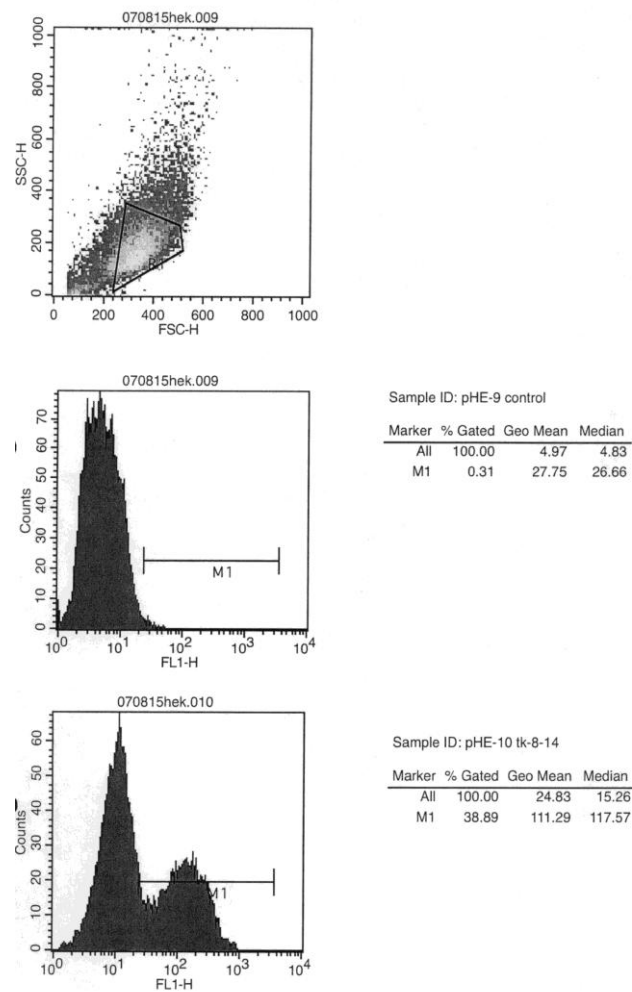


Sample ID: pHE-5 control

Marker	% Gated	Geo Mean	Median
All	100.00	4.84	4.66
M1	0.82	53.16	48.04

Kuva 10. Esimerkki virtaussytometrillä mitatusta epäonnistuneesta transfektiosta. Ylin: portitettu solupopulaatio. Keskellä: immunovärjätty negatiivinen kontrolli. Alin: immunovärjätty positiivinen kontrolli, jossa ei kuitenkaan näy positiivista solupopulaatioita.





Kuva 11. Esimerkki virtausytometrillä mitatusta onnistuneesta transfektiosta. Ylin: portitettu solupopulaatio. Keskellä: immunovärjätty negatiivinen kontrolli. Alin: immunovärjätty positiivien kontrolli, jossa on n. 40- prosenttinen positiivinen solupopulaatio.

#### 4.5 Immunoaffiniteettikromatografia

Kun solulysaatteja oli kerätty tarpeeksi, niistä puhdistettiin proteiini kromatografisesti. VAP- 1 mutanttiproteiinit puhdisti biokemian opiskelija Pro gradu- tutkielmaansa varten. Itse puhdistin täysin samaa protokollaa käyttäen villityyppi hVAP-1:tä CHO -solulinjasta, joka ekspressoisi VAP-1:tä.

Esimerkkipuhdistus: lisaatti (18 ml) sentrifugoitiin mahdollisen sakan poistamiseksi ja se konsentroitiin Sentriprep- mikrokonsentraattoria (Millipore) käyttäen pienempään tilavuuteen. Suoritetaan myös puskurinvaihto ajopuskuriin (25 % + 75 %) pylvään avulla. Kolonni oli tehty valmiiksi muiden toimesta ja siihen oli kiinnitettynä VAP-1:tä tunnistava monoklonaalinen vasta-aine (JG- 2). Kaikki käytettävät liuokset oli suodatettava (0,22 µm:n suodatin). Laitteen tasapainotuksen jälkeen konsentroitua ja näytepuskuriin vaihdettu näytemateriaali injektoidiin ruiskulla hitaasti kolonniin. Annettiin kiinnittyä kolonniin 30 min. Käynnistettiin ajo ja kun tausta ( UV- detektointi ) oli asettunut, aloitettiin eluointi ja kerättiin fraktiot. Koska eluointi tapahtuu pH:n muutoksen avulla (eluointipuskuri oli hapan), piikin näkyessä detektorilla talteen otettavat fraktiot neutraloitiin muutamalla tipalla neutralointipuskuria. Kolonni ja laite pestiin. Oikeat fraktiot yhdistettiin ja vaihdettiin Kaliumfosfaattipuskuriin ja konsentroitiin noin 1 ml:n tilavuuteen Centricon-mikrokonsentraattorilla (Millipore).<sup>22</sup> Proteiini säilöttiin + 4° C:een. Kuviossa 1 on esitetty ajon kuvaaja. Piikin osoittamat fraktiot 4-7 kerättiin.

Kolonni: Amersham Bioscience HiTrap™ NHS-activated 5 ml

Mab : JG- 2 vastaan VAP-1

Virtausnopeus: 1,5 ml /min.

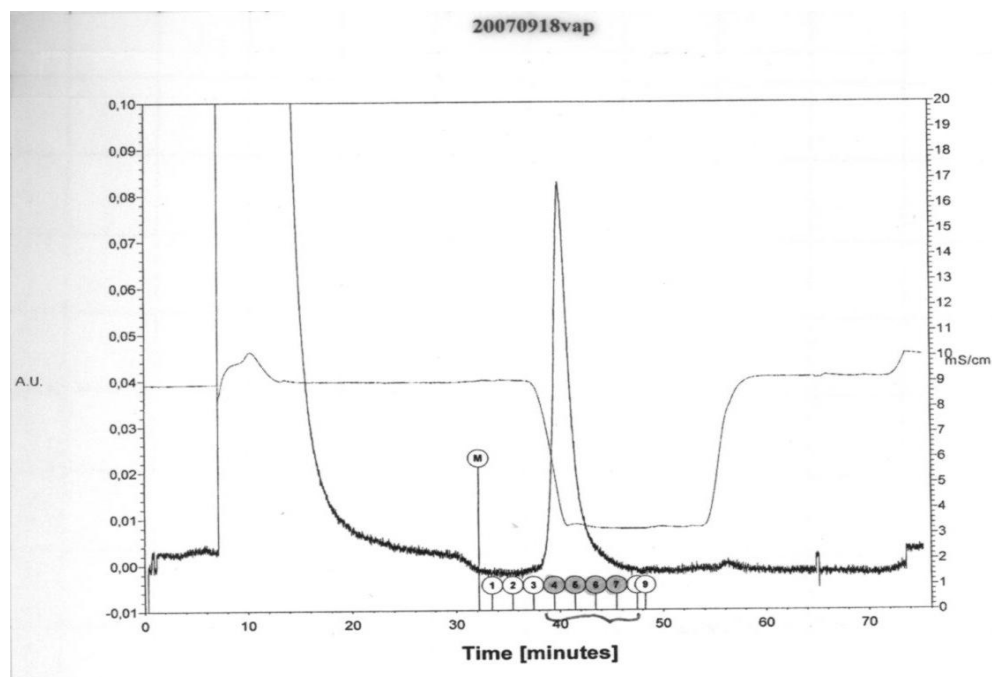
Ajoaika kolonnissa 30 min.

Laite: BioRad Logic System, LP Data View™ Software

Laitteen käyttö ja tarvikkeet : [www.bio-rad.com/affinitypurification](http://www.bio-rad.com/affinitypurification)

[www.bio-rad.com/chrommedia](http://www.bio-rad.com/chrommedia)

Mikrokonsentraattorit: [www.millipore.com](http://www.millipore.com)



Kuvio1. Esimerkki proteiinin puhdistuksen kuvaajasta. Kerätty fraktiot 4-7.

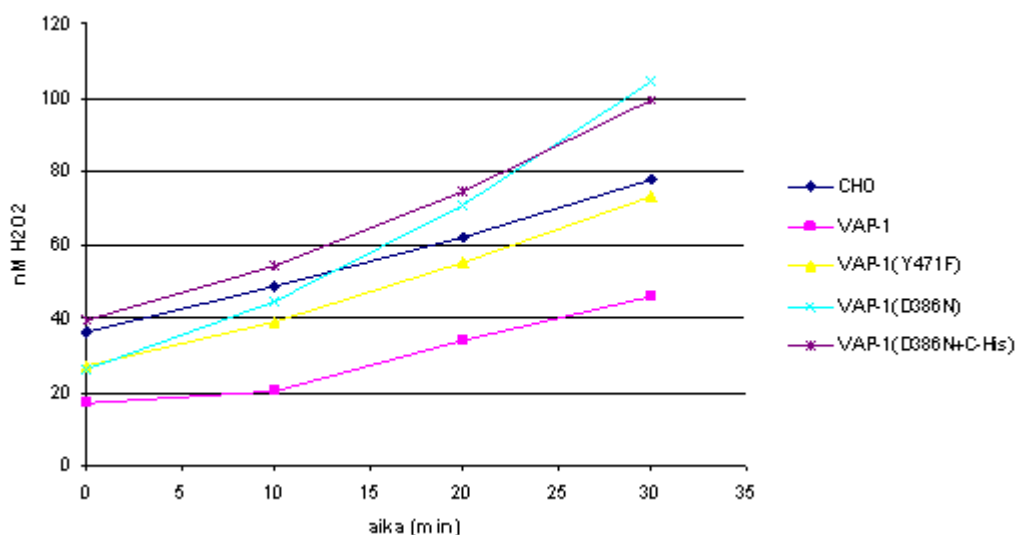
#### 4.6 Amplex- assay VAP-1 / HEK- lisaateille

HEK-lisaateilla aloitettiin aktiivisuuskokeet testaten, löytyykö mutanteista inaktiivisuutta ja kannattaako stabiileja solutuottolinjoja valmistaa. Punnittiin inhibiittorit clorgylin (Sigma) ja semikarbatsidi (Sigma) ja liuotettiin ne pitoisuudeltaan 20 mM:ksi KRPB- puskuriin. Mitattavat lisaatit sulatettiin jäällä. Valkoiselle 96- kuoppalevyllä (Nunc) pipetoitiin kaavion mukaan KRPB- puskuri, clorgyliiniä 10  $\mu$ l, semikarbatsidia 10  $\mu$ l ja lisaatteja 5  $\mu$ l. Inkuboitiin 37° C: ssa 30 min. Inkuboinnin aikana laimennettiin substraatti (bentsylaminiini, Sigma) 200 mM:n varastoliuokseksi ja siitä edelleen laimennossarja 100 mM, 20 mM, 10 mM ja 2 mM. Valmistettiin standardiliuos: 5000  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3 % vetyperoksidiliuosta 4,5  $\mu$ l + 995  $\mu$ l KRPB- puskuria). Tästä tehtiin edelleen laimennos 5  $\mu$ M:ksi käyttölaimennokseksi. Suojattiin valolta ennen käyttöä. Valmistettiin väriliuos: 0,02  $\mu$ l + 0,2  $\mu$ l HRP + 40  $\mu$ l KRPB-puskuria / kuoppa.

Levyn inkuboinnin jälkeen lisättiin substraattia eri konsentraatioissa 10  $\mu$ l/kuoppa kaavion mukaan, standardit 15-55  $\mu$ l standardikuoppiin ja lopuksi Amplex- väri-liuosta 40  $\mu$ l joka kuoppaan. Levy mitattiin välittömästi fluorimetrimillä (Tecan, Magellan Software).<sup>4</sup> Ohjelma mittaa levyn + 37° C:en lämpötilassa 60 minuutin ajan 10 minuutin sykleissä. Excel - taulukon arvoista analysoitiin tulokset tietokoneohjelmalla. Pipetointikaavio vaihteli sen mukaan, mitä inhibiittoreita ja substraatteja käytettiin, sekä näytemäärän mukaan.<sup>4,17</sup>

KRPG-liuos: Krebs-Ringer- HEPES buffer, pH 7,4.

”Fluoresenssisignaali on suoraan verrannollinen reaktiossa muodostuneen vetyperoksidin määrään. Vetyperoksidistandardien avulla voitiin määrittää kuopissa tietyssä aikana muodostuneen vetyperoksidin määrä. Inhiboiduissa kuopissa vetyperoksidin muodostus on estetty. Spesifinen aktiivisuus saatiin, kun inhiboiduissa kuopissa tietyssä ajanjaksona tapahtunut fluoresenssin nousu vähennettiin näytekuoppien fluoresenssin noususta, ja kerrottiin saatu muutos standardin kulmakertoimella”.<sup>17</sup> Amplex- analysoinnin esimerkki on esitetty kuviossa 2. (Analysoinnit on suorittanut tutkija).



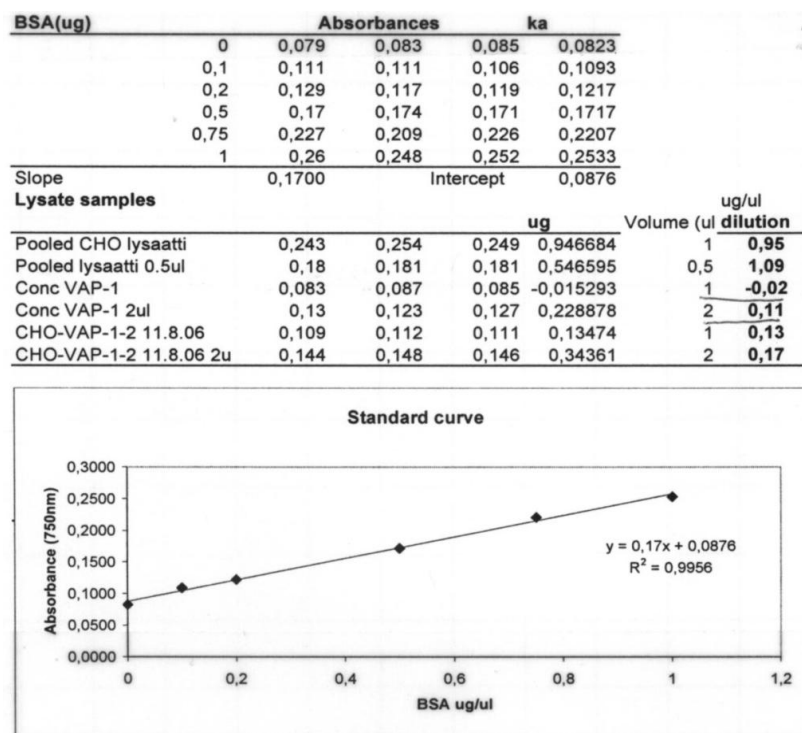
Kuvio 2. Esimerkki fluoresenssiin perustuvan aktiivisuusmäärittelyn analysoinnista puhdistetusta proteiinista. Tulos ei ole halutunlainen todennäköisesti siksi, että VAP- 1 kontrolli on eri detergentissä kuin muut lysaatit ja sen aktiivisuus on pienempi kuin inaktiivisiksi oletettujen transfektanttien aktiivisuudet. Tutkimuksessa siirryttiin radioaktiiviseen mittaukseen.<sup>20</sup> Kuva: Minna Peippo.

Käytettiin : Amplex® Red A 12222, Invitrogen . Tietoa ja tarkemmat ohjeet löytyvät valmistajalta : <http://products.invitrogen.com/ivg/product/A12222>

#### 4.7 Proteiininmittaus ( Lowry Method)

Lysaattien kokonaisproteiinikonsentraatioita mitattiin BioRadin DC- reagenssien avulla kolorimetrisella määrittelyllä, joka perustuu Lowry- metodiin (Lowry ym. 1951). Määrittely voidaan suorittaa näytteen ollessa detergentti- ym. liuoksessa. 10 mg / ml BSA (Bovine Album serum) – varastoliuoksesta tehtiin laimennossarja standardisuoraa varten: 0 mg, 0,1 mg, 0,2 mg, 0,5 mg, 0,75 mg ja 1 mg :n pitoisuudet. Pipetoitiin värittömälle 96- kuoppalevyille 5 µl puskuria 0- näytteeksi ja standardeja kolminkertaisina rinnakkaisnäytteinä, sekä 1 µl lysaattinäytteitä kahtena rinnakkaisnäytteenä. Kaikkiin kuoppiin pipetoitiin reagenssia A 25 µl. (Reagenssi A valmistetaan sekoittamalla 5 µl DC- reagenssia S / 250 µl reagenssia A. Laskettava tarvittava määrä), sekä 200 µl reagenssia B joka kuoppaan ja inkuboitui 15 min/ RT. Absorbanssit mitattiin kolorimetrillä (Multiskan) 750 nm:n suodattimella. Tulokset tallennettiin levykkeelle ja analysoitiin käyttämällä Excel-ohjelmaa. Kuviossa 3 on esitetty esimerkki proteiinin mittausanalyysistä.

Menetelmä löydettävissä: [www.bio-rad.com/proteinassays](http://www.bio-rad.com/proteinassays)



Kuvio 3. Esimerkki proteiinin mittauksista lysaateista

#### 4.8 SDS-PAGE ( Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis )

Proteiinikemiassa paljon käytetty erottelu- ja analyysimenetelmä on natriumdodekyylisulfaattipolyakrylamidigeelielektroforeesi (engl. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE), joka erottelee proteiinit niiden koon perusteella, ja jonka avulla saadaan selville niiden molekyylipaino. Geeli voi olla homogeeninen tai gradienttigeeli, jolla saadaan parempi erottelukyky. Tässä työssä käytettiin homogeenista ns. minigeeliä, koska kyseessä oli nopea tarkistus affiniteettipuhdistuksen jälkeen kahdesta eri puhdistuksesta.

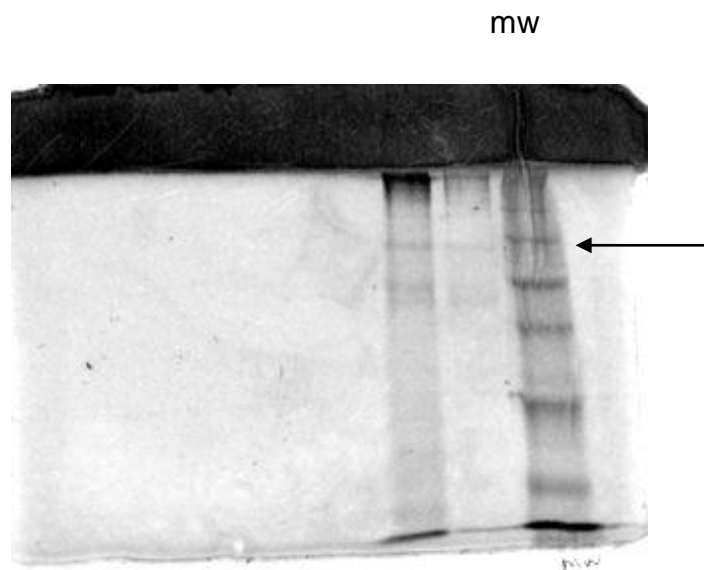
Geeli valettiin kahden lasilevyn väliin levyksi (engl. slab-gel ). Pinnalle lisättiin n. 1 ml vedellä saturoitua isobutanolia estämään geelin pinnan liiallista kuivumista. Geelin annettiin polymerisoitua huoneenlämmössä 30- 60 min. Tämän jälkeen huuhdeltiin isobutanoli ja mahdollisesti jähmettymätön geeliaines pois geelin pinnalta. Pinta kuivattiin imupaperilla. Sen jälkeen pinnalle kaadettiin ns.

ylägeeli (engl. stacking gel), johon asetetaan kampa (kolot näytteiden lataamista varten). Annettiin polymerisoitua 30- 45 min. Näytteet (2 µl proteiininäytettä) laimennettiin Laemmli- näytekusuriin 1:4 ja lämmitettiin 95 °C:ssa 5 min. Puskuri sisältää 2-Merkaptoetanolia, joka pelkistää proteiinin katkoen rikkisillat (näin saadaan proteiinien konfirmaatio hajotettua ennen geelijoa) ja SDS:ää, jonka negatiivinen varaus kuljettaa proteiineja geelissä niiden molekyylipainojen mukaisesti. On käytettävä suurin piirtein samaa näytekonsentraatioita ja ladattava yhtä suuressa volyymissä jokaiseen kaivoon, jotta näytteet kulkisivat tasaisesti ajon aikana. Jähmettyneestä geelistä poistettiin kampa ja huuhdeltiin näytekaivot. Geelijaioite koottiin valmistajan ohjeen mukaisesti. Lisättiin puskurialtaisiin elektroforeesipuskuria ja ladattiin näytteet sekä proteiinien koon osoittava molekyylimarkkeri (standardi, jonka molekyylipainot tunnetaan) kaivoihin.<sup>15</sup> Lisättiin yläaltaaseen sopiva määrä elektroforeesipuskuria ja asetettiin laitteen kansi paikoilleen. Johdot liitettiin virtalähteeseen. Geelin annettiin ajautua n. 45 min 200 V. Tässä työssä käytettiin BioRadin Mini- Protean II- ajolaitetta.

Elektroforeesiajon jälkeen geeli siirrettiin värjäysliuokseen, Page blue <sup>TM</sup> Protein Staining Solution( Fermentas). Liuos on valmis käytettäväksi ja se sisältää Coomassie Brilliant Blue G-250 – väriä. Värjäyksen jälkeen geeli kuivattiin vakuumpumpun avulla kuivurissa (kuva 12).

Menetelmästä ja materiaaleista löytyy tarkkaa tietoa mm. Coligan ym. Current protocols in immunology. Laboratory manual 1-3 ja laitteen valmistajalta:

[www.bio-rad.com/verticalelectro/](http://www.bio-rad.com/verticalelectro/)



Kuva 12. Oikealla molekyylisandardi ja kaksi proteiininäytettä ajettuna mini-SDS- PAGE:lla. VAP-1 on 170 kDa.



## 5 Tulosten tarkastelu ja pohdinta

Yhteenvedona voidaan todeta, että työmenetelmät toimivat ja niitä voidaan käyttää karakterisointiin. Tavoitteena oleviin proteiinitason tutkimuksiin päästiin niiden avulla.

Pistemutaatiot onnistuivat nopeasti. Mutatoidut DNA- konstruktit saatiin tehtyä ja ne olivat toimivia. Niiden transfektoiminen solulinjaan oli haastavampaa, mutta kuitenkin saatiin lopulta onnistumaan transientit VAP-1<sub>D386N</sub> - ja VAP-1<sub>D386N+C-His</sub> - transfektantit tämän työn aikana. VAP-1<sub>D386N+N-His</sub> ei monista yrityksistä huolimatta onnistunut ja syyksi epäiltiin histidiinihännän aktiivisuuden vaikeuttavan transfektiota. C-terminaalisen "His-tagin" transfektio sen sijaan onnistui tämän työn aikana. Soluviljely siten, että solut ovat juuri oikeassa kasvutiheydessä ja muutenkin hyvässä kunnossa transfektiota varten (solut hyvin kiinnittyneitä, ei kuolleita soluja tai kontaminaatioita), osoittautui haasteelliseksi soluviljelytyön ollessa uutta ja työskenneltäessä normaalin työajan puitteissa. Solujen siirrostus täytyy ajoittaa aina solujen jakautumisnopeuden mukaan ennen kuin liian täydessä maljassa kosketusinhibitio lopettaa kasvun. Työn aikana monet transfektiotehokkuuden testaukset immunofluoresenssivärjäyksellä tutustuttivat virtausytometriin, jolla ne analysoitiin.

Aktiivisuuskokeet kerätyistä lysaateista osoittivat, että mutaatioiden aikaansaamaa oletettua inaktivoitumista tapahtuu proteiinissa, ja että suuritöiset stabiilit (pysyvät) tuottolinjat kannattaa tehdä onnistuneista transfektanteista tuottamaan mutanttiproteiineja. Pro gradu- tutkielmaansa tekevä biokemian opiskelija teki niistä pysyvät tuottosolulinjat, joita ylläpidin opinnäytetyön aikana keräten solulysaatteja proteiinin puhdistusta varten. Tuottolinjojen stabiilisuutta testattiin immunofluoresenssivärjäyksillä. Puhdistuksen suoritti opiskelija immunoaffiniteettikromatografialla, ja itse puhdistin villityyppi- hVAP-1:tä samalla protokollalla. Onnistuimme puhdistuksissa ja puhtaus oli riittävä, mutta saannot olivat pienet (n. kahdestakymmenestä keskikokoisesta

soluviljelypullosta saatiin alle 100µg puhdasta proteiinia). Nykyään puhdistus on siirretty isomman mittakaavan menetelmällä tehtäväksi.

Varsinaisen tutkimuksen vastinmolekyylin etsimiseksi aloitti biokemian opiskelija Pro gradu- tutkielmaansa varten. Hän erotteli virtaussatometrillä transfektoiduista soluista immunovärjätyt solut kolme kertaa, jonka jälkeen noin 50 % soluista oli VAP-1 positiivisia. Tutkimus aloitettiin hänen toimestaan solulysaateista tekemällä fluoresenssiin perustuvia aktiivisuusmittauksia, mutta saadut tulokset osoittivat, ettei menetelmä soveltunut tarkoitukseen koska villityypin VAP-1 (negatiivinen kontrolli) oli lysoitu eri detergentillä. Lysaattien säästämiseksi tutkimus siirtyi suoraan radioaktiiviseen aktiivisuusmäärittelyyn, jossa mitattiin radioaktiivisen aldehydin muodostumista. Menetelmä toimi hyvin ja tulos osoitti selkeästi mutanttien inaktiivisuuden. Substraatin sitoutumiskokeet tehtiin puhdistetulla proteiinilla. Vain VAP-1<sub>D386N</sub> varianttia ehdittiin puhdistamaan. Proteiinia oli kuitenkin liian vähän, jotta olisi voitu luotettavasti mitata substraatin sitoutuminen mutanttiproteiiniin tämän työn aikana.<sup>20</sup>

Tutkimukset vastinmolekyylien etsimiseksi tulevat jatkumaan tutkimusryhmässä.

## 6 Lähteet

- <sup>1</sup> Heino, J.; Vuento, M. 2007. Biokemian ja solubiologian perusteet. Oppimateriaali. WSOY: Helsinki
- <sup>2</sup> Kurkijärvi, R. 2004. Circulation form of vascular adhesion protein-1 (VAP-1). Väitöskirja. Lääketieteellisen mikrobiologian laitos, Turun yliopisto, MediCityn tutkimuslaboratorio, Turun yliopisto ja Kansanterveyslaitos, Mikrobiologian ja tulehdustautien osasto, Turku.
- <sup>3</sup> Grön, K. 1999. Vascular adhesion protein-3 (VAP-3); geenin kloonaukseen ja karakterisointi. Pro gradu-tutkielma. Helsingin yliopisto, Biotieteiden laitos, Perinnöllisyystieteiden osasto.
- <sup>4</sup> Elovaara, Heli, FT. Henkilökohtainen tiedonanto tai työhje. MediCity, Turun yliopisto
- <sup>5</sup> Kivi, E. ym. Human Siglec-10 can bind to vascular adhesion protein-1 and serves as its substrate. Blood 2009 114:5385-5392
- <sup>6</sup> Klinman, J.P.; Mu, D. 1994, annu rev biochem 269:99216-9932.
- <sup>7</sup> Suominen, I.; Ollikka, P. 2006. Yhdistelmä- DNA- tekniikan perusteet. 3-3. painos. Opetushallitus. Hakapaino Oy, Helsinki.
- <sup>8</sup> Lahti, R. Proteiinien geneettinen muokkaus. Biokemian ja elintarvikekemian laitos / Biokemia. Turun yliopisto. Saatavilla www- muodossa: [www.edu.fi/oph/abc/dna/protmuok.html](http://www.edu.fi/oph/abc/dna/protmuok.html)
- <sup>9</sup> Mc Murry, J ; Simanec, E. 2007. Fundamentals of Organic Chemistry, Sixth Edition. Student Edition ISBN 0-495-01203-3. Thomson Brooks/Cole, a part of The Thomson Corporation. USA.
- <sup>10</sup> Niemi, M.; Korhonen, I. ; Virtanen, I. 1989. Solu- ja molekyylibiologia. 3. painos. Tammer-paino oy. Weilin+ Göös: Tampere 1992.
- <sup>11</sup> BioTop/ transfektioreagenssit. Saatavilla www- muodossa: [www.biotop.fi](http://www.biotop.fi)
- <sup>12</sup> Törrönen, K. 2006. Solunetti / Solubiologia. Kuopion yliopisto / Suomen virtuaaliyliopiston verkkosivut. Saatavilla www- muodossa: [www.solunetti.fi](http://www.solunetti.fi)
- <sup>13</sup> Virtanen, I 2008. Soluviljely. Helsingin yliopisto. Saatavilla www- muodossa: [www.ept.tkk.fi/Teaching/S01104/soluviljely%20TKK.pdf](http://www.ept.tkk.fi/Teaching/S01104/soluviljely%20TKK.pdf)
- <sup>14</sup> Leppiniemi, J. Virtausytometria. Tampereen yliopisto. Saatavilla www-muodossa: [www.laborantti.net/virtausytometria.htm](http://www.laborantti.net/virtausytometria.htm)
- <sup>15</sup> Edited by Coligan, J.E ym. 1991. Current Protocols in Immunology. Laboratory manual 1-3. John Wiley & Sons Inc. USA.

- <sup>16</sup> Riekkola, M-L.; Hyötyläinen, T. 2002. Kolonnikromatografia ja kapillaarelektromigraatiotekniikat. 2. painos. Yliopistopaino: Helsinki
- <sup>17</sup> Aalto, K. 2008. Leukosyyttien liikenteeseen liittyvien liukoisten adheesiomolekyylien syntymekanismit ja merkitys elimistössä; liukoisen vaskulaarisen adheesioproteiini-1:n aktiivisuuden määrittäminen seerumista. Pro gradu-tutkielma. Biokemian ja elintarvikekemian laitos, Turun yliopisto.
- <sup>18</sup> BioRad. Saatavilla www- muodossa: [www.bio-rad.com/proteinassays](http://www.bio-rad.com/proteinassays)
- <sup>19</sup> Finnzymes. Saatavilla, www-muodossa:  
[www.finnzymes.com/sequencing\\_mutagenesis/phusion\\_site-directed\\_mutagenesis\\_kit.html](http://www.finnzymes.com/sequencing_mutagenesis/phusion_site-directed_mutagenesis_kit.html)
- <sup>20</sup> Peippo, M. 2009. Kupariamiinioksidaasien entsyymaattinen reaktiomekanismi sekä VAP-1 D386:n tuotto, puhdistus ja karakterisointi. Pro gradu- tutkielma. Turun yliopisto, Biokemia.
- <sup>21</sup> Castren, M. 1997. Virtausytometrian perusteet- ohjekirja. Oriola Oy Prolab. Becton Dickinson
- <sup>22</sup> Nymalm, Y; Kidron, H ; Söderholm, A ; Viitanen, L ; Kaukonen, K; Pihlavisto, M; Smith, D; Veromaa, T; Airene, TT; Johnson, MS; Salminen, TA. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. P 2003 Jul;59(Pt 7):1288-90. Epub 2003 Jun 27

## LIITE 1/1

Käytetyt kasvatusmediumit

DMEM HEK-EBNA kasvatuksille:

400 ml DMEM (valmis liuos mediumintekopalvelusta, THL)

50 FCS

5 ml L-glutamiini

640 µl penisilliini+streptomysiiniliuosta

42 µl genetisiiniä

Genetisiini: 300 mg G418 / 1 ml steriiliä vettä

HEC-liuos:

400 ml RPMI-1640 (THL)

50 ml FCS

5 ml L-glutamiini

640 µl penisilliini+ streptomysiini

CHO kasvatuksille:

400 ml  $\alpha$ - MEM (THL)

50 ml FCS

5 ml L-glutamiini

640 µl penisilliini+streptomysiini

## LIITE 1/2

Irrotusliuos:

400 ml Hanks'in suolaliuosta ilman  $\text{Ca}^{2+}$  ja  $\text{Mg}^{2+}$ -ioneja (THL)

800  $\mu\text{l}$  7%  $\text{NaHCO}_3$

10 ml 1 M HEPES

Lisätään 5 ml trypsin/EDTA / 45 ml irrotusliuosta

OptiMEM : kaupallinen

## LIITE 2

EPICS- puskurien ohjeet

EPICS -1: 400 ml EPICS- PBS

1 ml 4 %  $\text{NaN}_3$

8 ml FCS

EPICS- 2: 400 ml EPICS- PBS

1 ml 4 %  $\text{NaN}_3$

EPICS- FIX : 400 ml EPICS - PBS

10,8 ml 37 % Formaldehydi

EPICS- PBS 1 l :

$\text{NaCl}$  8,47 g

$\text{K}_2\text{HPO}_4$  3,14 g

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,36 g

Aqua lis. litraksi